

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018179

International filing date: 07 December 2004 (07.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-408744
Filing date: 08 December 2003 (08.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 February 2005 (03.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

09.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 8 日
Date of Application:

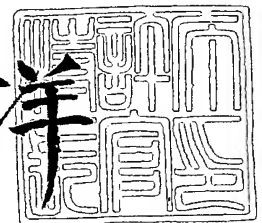
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 8 7 4 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 0 8 7 4 4]

出 願 人 独立行政法人産業技術総合研究所
Applicant(s): 国立長寿医療センター総長

2 0 0 5 年 1 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P178
【提出日】 平成15年12月 8日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都江東区青海 2-4-1-6
 独立行政法人産業技術総合研究所
 臨海副都心センター内
 【氏名】 夏目 徹
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3-6-3
 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター内
 【氏名】 渡辺 研
【特許出願人】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
 【電話番号】 029-861-3280
【特許出願人】
 【識別番号】 501304319
 【氏名又は名称】 国立療養所中部病院長
【代理人】
 【識別番号】 100112874
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 渡辺 薫
 【電話番号】 03-5484-7630
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

プロテアソームと相互作用する性質を有することを特徴とする配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質。

【請求項 2】

ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有することを特徴とする配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質。

【請求項 3】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質の発現又は機能を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。

【請求項 4】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とプロテアソームとの相互作用を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。

【請求項 5】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とポリユビキチン鎖の相互作用を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。

【請求項 6】

廃用性筋萎縮治療剤製造のための、配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用の使用。

【請求項 7】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 8】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカー。

【請求項 9】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の発症リスク評価方法。

【請求項 10】

廃用性筋萎縮治療剤製造のための、配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用の使用。

【請求項 11】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 12】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカー。

【請求項 13】

配列番号 1 又は配列番号 2 からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の発症リスク評価方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質間の新規相互作用及び新規相互作用を利用した廃用性筋萎縮治療剤又は廃用性筋萎縮に係わる方法。

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質間の新規な相互作用に関する。また、タンパク質間の新規な相互作用に基づいた廃用性筋萎縮治療剤、及び、廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法、疾病診断用マーカー、発症リスク評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトゲノム（全遺伝情報）のDNA塩基配列の解析がほぼ終了し、今後の研究課題は、DNAにコードされる遺伝子の機能を解明するという方向に移ってきている。DNAにコードされる遺伝情報の多くは、タンパク質に関するものであり、タンパク質の構造、機能、役割等を明らかにすることにより、遺伝子の機能を解明しようとする研究が、各研究機関で行われている。

【0003】

生体内では、遺伝情報に基づいて、多くのタンパク質が発現し、それらのタンパク質が相互作用を起こすことにより、生命活動が維持されている。例えば、細胞内の代表的な代謝経路であるクエン酸回路は、複数の酵素（タンパク質）が相互作用することにより、ピルビン酸を分解し、ATP産生のためのエネルギーを供給する。

【0004】

また、生体に引き起こされる疾患の多くは、細胞内のタンパク質間の相互作用に異常が生じて、発生すると考えられる。例えば、遺伝性疾患の場合、正常なタンパク質が発現しないため、必要なタンパク質間相互作用が欠損したり、タンパク質間相互作用に異常が生じたりして、代謝異常を起こし、疾患が発生する。

【0005】

従って、生体内で発現する各種タンパク質について、タンパク質間の相互作用を明らかにすることは、細胞内の反応経路を解明したり、各タンパク質の機能や役割を明らかにしたりする上で、重要である。また、タンパク質間の相互作用を明らかにすることにより、各種疾患の発生機序を解明したり、治療剤を開発したりする上で、有効な情報を提供することができる。

【0006】

ここで、本発明に関連する4つのタンパク質、プロテアソーム、ユビキチン、ZNF216、AWP1について、説明する。

【0007】

プロテアソームは、核及び細胞質に局在する高分子のプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）で、28個のサブユニットからなる分子量70～80万のタンパク質である。プロテアソームの両端にそれぞれPA70（活性化因子）が結合した「26Sプロテアソーム」は、ATP依存的に、タンパク質を分解する機能を持ち、ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系の中心的な役割を担っている。26Sプロテアソームは、ポリユビキチン化（ポリユビキチン鎖によって修飾）されたタンパク質を選択的に分解する（非特許文献1）。

【0008】

また、プロテアソームは、廃用性筋萎縮の発症機序にも関与している（非特許文献2、非特許文献3）。廃用性筋萎縮とは、例えば、寝たきり状態が続く、筋肉を使わない状態が持続する場合に、筋肉の大きさが減少し、筋力低下が起こってくることをいう。筋肉を使わない状態が続くと、ミオシン等の筋肉を構成するタンパク質が、ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系において分解されるため、筋肉の大きさが減少して発症するものと考えられる。

【0009】

ユビキチンは、真核生物に普遍的に存在する、アミノ酸76個からなるタンパク質で、ユビキチン/プロテアソームタンパク質分解系において、分解するタンパク質（標的タンパク質）を標識する役割を持つ。ユビキチン/プロテアソームタンパク質分解系では、ポリユビキチン鎖が標的タンパク質を標識する役割を果たす。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンが多数枝状に結合したもので、標的タンパク質の特定部位に結合している。標的タンパク質にポリユビキチン鎖が結合していると、26Sプロテアソームが標的タンパク質を認識して、標的タンパク質を分解する（非特許文献1参照）。

【0010】

ZNF216は、1998年に、D. A. Scottらによって、ジンクフィンガータンパク質として、遺伝子が同定されたタンパク質である（非特許文献4）。また、AWP1は、2000年にW. Duanらによって単離された新規なタンパク質である（非特許文献5）。いずれのタンパク質も、生体内における具体的な機能、役割は、まだわかっていない。

【非特許文献1】「実験医学」，羊土社，2003年2月，第21巻，第3号，p. 330-332

【非特許文献2】Gomes et al “Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, Vol. 98, No. 25, pp14440-14445

【非特許文献3】Bodine et al “Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy”, Science, 2001, Vol. 294, pp. 1704-1708

【非特許文献4】D. A. Ccotti et al “Identification and mutation analysis of a cochlear-expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19”, AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, Elsevier Science B.V., 1998, p461-469

【非特許文献5】W. Duan et al “Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo”, AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES, GENOMES AND EVOLUTION, Elsevier Science B.V., 2000, pp113-121

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

生体内に発現するタンパク質の多くは、どのタンパク質と相互作用し、どのような機能、役割を担っているのか、未解明なままである。そこで、本発明は、タンパク質間相互作用の網羅的な解析を行うことによって、タンパク質間の新規な相互作用を提供する。また、機能未知のタンパク質と、特定の疾病の発症に関与することが知られているタンパク質と、の相互作用を見出すことにより、その疾患の治療剤を提供する。さらに、この新規な相互作用に基づいて、前記特定疾患に関するスクリーニング方法、診断用マーカー、発症リスク評価方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

今回、タンパク質間相互作用に網羅的な解析より、タンパク質分解系において中心的な役割を果たすプロテアソームと、生体内における機能の未知なZNF216（配列番号1からなるタンパク質）又はAWP1（配列番号2からなるタンパク質）との間に、相互作用があることを、新規に見出した。即ち、ZNF216又はAWP1は、プロテアソームと相互作用する性質を有し、プロテアソームは、ZNF216又はAWP1と相互作用する性質を有する。

【0013】

前記のとおり、プロテアソームは、廃用性筋萎縮の発生機序に関与していることがわかっている。ある個体が寝たきり等の状態になった場合、その個体の生活環境の変化に対応するため、その個体の各細胞内では、様々な細胞内応答が引き起こされていると考えられ

る。その細胞内応答は、タンパク質間の相互作用によって次々と伝達され、最終的には、プロテアソームとの相互作用によって、筋肉を構成するタンパク質を分解する反応が起きる。従って、ある個体が寝たきり等の状態になった場合に、細胞内応答によって生じる多くのタンパク質間相互作用のうちの、一つのタンパク質間相互作用の結合特性を変化させれば、筋萎縮（プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解）を止めることができる。

【0014】

そこで、本発明では、プロテアソームと相互作用する性質を有する ZNF216 又は AWP1 の発現を抑制する廃用性筋萎縮治療剤を提供する。ZNF216 又は AWP1 の発現を抑制することにより、ZNF216 又は AWP1 とプロテアソームとの間の相互作用による情報伝達が抑えられるため、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解が抑制される。従って、筋肉が減少せず、廃用性筋萎縮を予防、治療することができる。

【0015】

ZNF216 又は AWP1 の発現を抑制する手段として、RNA 干渉を応用することができる。RNA 干渉 (RNA Interference) とは、二本鎖 RNA によって、その配列に特異的な mRNA が分解され、その結果、遺伝子の発現が抑制される現象をいい、短い RNA (siRNA、short interfering RNA) を用いることにより、哺乳類にも応用が可能である。

【0016】

本発明に係る二本鎖 RNA は、ZNF216 をコードする DNA 配列（配列番号 3）又は AWP1 をコードする DNA 配列（配列番号 4）の一部（18～24 塩基）に対応する配列を持つものを用いる。この二本鎖 RNA は、短いもの（18～24 塩基）であれば、標的配列（配列番号 3 又は配列番号 4 の配列）のどの部分に対応していても、ZNF216 又は AWP1 の発現をある程度抑制できると考えられるが、二本鎖 RNA の作製の際には、TTTT 又は AAAAA の配列を含まず、RNA の二次構造が開いていると予想される箇所の配列を選ぶ方が、発現を効果的に抑制できるので、より好適である。

【0017】

その他、ZNF216 又は AWP1 とプロテアソームとの間の相互作用が起きないようにするため、ZNF216 又は AWP1 自体の機能を阻害又は抑制する廃用性筋疾患用治療剤を用いてもよい。また、ZNF216 又は AWP1 とプロテアソームの間の相互作用自体を阻害又は抑制することにより、筋萎縮を予防、治療することもできる。

【0018】

また、今回、タンパク質分解系において標識の役割をするポリユビキチン鎖と、生体内における機能の未知な ZNF216 又は AWP1 との間にも、相互作用があることがわかった。即ち、ZNF216 又は AWP1 は、ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有し、ポリユビキチン鎖は、ZNF216 又は AWP1 と相互作用する性質を有する。

【0019】

廃用性筋萎縮の場合、プロテアソームは、ポリユビキチン鎖の結合している筋肉構成タンパク質を分解していると考えられる。ポリユビキチン鎖は、ZNF216 又は AWP1 との相互作用によって情報が伝達されて、筋肉構成タンパク質と結合するため、ポリユビキチン鎖と ZNF216 又は AWP1 との間の相互作用が抑制されると、情報伝達が抑制されて、筋肉構成タンパク質との結合が抑制される。また、ポリユビキチン鎖と ZNF216 又は AWP1 との間の相互作用が抑制された場合、情報伝達が阻害されて、ポリユビキチン鎖とプロテアソームとの間の相互作用を抑制することも考えられる。この場合も、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解が抑制される。

【0020】

そこで、前記と同様に、本発明では、ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有する ZNF216 又は AWP1 の発現を阻害する廃用性筋萎縮治療剤を提供する。ZNF216 又は AWP1 とポリユビキチン鎖との間の相互作用による情報伝達が行われなくないようにするため、ZNF216 又は AWP1 自体の機能を直接阻害又は抑制する治療剤を用いても

よい。また、ZNF216又はAWP1とポリユビキチン鎖の間の相互作用自体を阻害又は抑制することにより、筋萎縮を予防、治療することもできる。

【0021】

次に、本発明では、廃用性筋萎縮治療剤製造のために、プロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を直接的に又は間接的に使用することができる。

【0022】

例えば、廃用性筋萎縮治療剤製造工程の過程において、前記相互作用を利用したスクリーニング方法を用いて目的の物質を選別し、この物質を廃用性筋萎縮治療剤製造に利用することができる。あるいは、治療剤の候補となる物質が正しく活性を持っているか否かを品質検査する場合に、前記相互作用を利用することができる。その他、この相互作用を、廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカーとして利用したり、発症リスクを評価する手段に応用したりすることもできる。

【0023】

そこで、まず、本発明では、プロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法を提供する。本発明に係るスクリーニング方法によって、対象とするタンパク質間の相互作用の結合特性を変化（阻害又は増進）させ得る化合物のスクリーニングを実施することができる。かかる化合物は、対象とするタンパク質間相互作用が関連する疾病（疾患）に対する治療薬又は予防薬の候補となり得る。

【0024】

このようなスクリーニングは、上記相互作用を検出するための反応条件に候補化合物を適切な濃度で添加して、相互作用に対する影響を調べる手法を含む。この手法は、従来の酵素標識免疫吸着アッセイ（ELISA法）と同様の手法としてスクリーニング可能である。そして96ウェルプレート上にプロテアソームあるいはZNF216又はAWP1を結合固定化し、そこにスクリーニング対象分子を添加し、さらにZNF216又はAWP1（ZNF216又はAWP1を固定化した場合はプロテアソーム）、標識抗体、基質の順で反応させ、スクリーニング対象物質が存在下でどのくらいプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の結合が変化するかを調べる。基質の発色が強い方が両者の結合は強いことになる。

【0025】

なお、薬物のスクリーニングは、NMR分光法やX線結晶解析や電子顕微鏡等による分子直接観察によっても可能である。また表面プラズモン共鳴センサ（SPR）を用いても効率よくスクリーニング可能で、プロテアソームかZNF216のいずれかをやはりSPRのセンサーチップ上に固定化し、スクリーニング対象分子を添加したZNF216又はAWP1（ZNF216又はAWP1を固定化した場合はプロテアソーム）をセンサーチップ上に送液する。両者の結合は表面プラズモン共鳴によりリアルタイムに結合曲線が観察され、両者の結合が強まれば結合曲線は増高し、弱まれば減弱あるいは消失する。

【0026】

また、本発明では、ZNF216又はAWP1又は該タンパク質をコードする遺伝子からなる廃用性筋萎縮用の疾病予防、診断用マーカーを提供する。

【0027】

ZNF216又はAWP1が、廃用性筋萎縮に関与することが明らかであるプロテアソームと相互作用を示すという、本願発明者らの鋭意研究の結果によって得られた全くの新知見に基づいて、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子は廃用性筋疾患の発症に関与することが判明した。このことから、ZNF216又はAWP1の発現状態や、このタンパク質をコードする遺伝子の変異（一塩基多型等）を調べることによって、廃用性筋疾患の診断に役立てることができる。即ち、ZNF216又はAWP1をコードする遺伝子は、廃用性筋疾患診断用マーカーとなる。

【0028】

さらに、本発明では、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺

伝子を用いる廃用性筋疾患の発症リスク評価方法を提供する。

【0029】

廃用性筋疾患にプロテアソームを介して関与することがわかったZNF216又はAWP1の発現状態を調べたり、このタンパク質のコードする遺伝子の変異や一塩基多型等を調べたりすることによって、将来に例えば寝たきり等になった場合の廃用性筋疾患の発症リスク評価を行うことができる。

【0030】

続いて、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、本発明では、廃用性筋萎縮治療剤製造のために、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用を直接的に又は間接的に使用することもできる。

【0031】

例えば、廃用性筋萎縮治療剤製造工程の過程において、前記相互作用を応用したスクリーニング方法を用いて目的の物質を選別し、この物質を廃用性筋萎縮治療剤製造に利用することができる。あるいは、治療剤の候補となる物質が正しく活性を持っているか否かを品質検査する場合に、前記相互作用を利用することができる。その他、この相互作用を、廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカーとして利用したり、発症リスクを評価する手段に応用したりすることもできる。

【0032】

そこで、まず、本発明では、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法についても提供する。上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、本発明に係るスクリーニング方法によって、対象とするタンパク質間の相互作用の結合特性を変化（阻害又は増進）させ得る化合物のスクリーニングを実施することができる。かかる化合物は、対象とするタンパク質間相互作用が関連する疾病（疾患）に対する治療薬又は予防薬の候補となり得る。

【0033】

また、本発明では、ZNF216又はAWP1、又は該タンパク質をコードする遺伝子からなる廃用性筋萎縮用の疾病予防、診断用マーカーを提供する。

【0034】

即ち、ZNF216又はAWP1が、廃用性筋萎縮に関与することが明らかであるポリユビキチン鎖と相互作用を示すという、本願発明者らの鋭意研究の結果によって得られた全くの新知見に基づいて、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子は廃用性筋疾患の発症に関与することが判明した。このことから、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、ZNF216又はAWP1の発現状態や、このタンパク質をコードする遺伝子の変異（一塩基多型等）を調べることによって、廃用性筋疾患の診断に役立てることができる。即ち、ZNF216又はAWP1をコードする遺伝子は、廃用性筋疾患診断用マーカーとなる。

【0035】

さらに、本発明では、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子を用いる廃用性筋疾患の発症リスク評価方法を提供する。

【0036】

廃用性筋疾患にポリユビキチン鎖を介して関与することがわかったZNF216又はAWP1の発現状態を調べたり、このタンパク質のコードする遺伝子の変異や一塩基多型等を調べたりすることによって、将来に例えば寝たきり等になった場合の廃用性筋疾患の発症リスク評価を行うことができる。

【0037】

なお、本発明におけるZNF216及びAWP1は、配列表の配列番号1及び配列番号2にそれぞれ示されたアミノ酸配列を有するタンパク質それ自体のみに狭く限定されるの

ではなく、プロテアソーム又はポリユビキチン鎖との間に相互作用があり、前記のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換、付加あるいは挿入されたタンパク質である場合も含むものとする。また、本発明における ZNF216 及び AWP1 をコードする cDNA の塩基配列を、配列番号 3 及び配列番号 4 にそれぞれ示したが、この塩基配列についても、前記の相互作用を失わないものであって、塩基配列の一部が欠失、置換、付加あるいは挿入されたものを含むものとし、コードするタンパク質それ自体のみに狭く限定されない。

【0038】

以上のように、廃用性筋萎縮に關与するタンパク質として知られているプロテアソームが、ZNF216（又は AWP1）と相互作用することが明らかになった結果、本発明は、この相互作用並びに ZNF216（又は AWP1）又は該タンパク質をコードする遺伝子が、廃用性筋萎縮向けの医薬の創薬技術、診断技術、検査技術、発症リスクの評価技術等に役立つという技術的意義を有する。また、プロテアソームのタンパク質分解系に關与するポリユビキチン鎖が、ZNF216（又は AWP1）と相互作用することが明らかになった結果、本発明は、この相互作用並びに ZNF216（又は AWP1）又は該タンパク質をコードする遺伝子が、廃用性筋萎縮向けの医薬の創薬技術、診断技術、検査技術、発症リスクの評価技術等に特に役立つという技術的意義も有する。

【発明の効果】

【0039】

本発明によって、プロテアソームと ZNF216（又は AWP1）の 2 つのタンパク質の間に、相互作用があることが明らかになった。また、ポリユビキチン鎖と ZNF216（又は AWP1）の間にも、相互作用があることが明らかになった。この、新規に見出されたタンパク質間相互作用に關する知見を利用することにより、廃用性筋萎縮治療剤を提供することができる。また、本発明で明らかになった新規の相互作用は、廃用性筋萎縮に關する創薬、診断、検査、発症リスクの評価等に特に有用である。

【実施例 1】

【0040】

本願発明者らは、ZNF216（配列番号 1 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質）及び AWP1（配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質）を認識して、相互作用を示す「パートナータンパク質」を、以下の方法によって効率的に探索した。

【0041】

ZNF216（及び AWP1）は、RT-PCR 法を用いて、このタンパク質をコードする cDNA を準備した。そして、ZNF216（又は AWP1）をコードする cDNA を、p cDNA-FLAG（プラスミド）に制限酵素的に組み込み、発現ベクターを作製した。p cDNA-FLAG は、ZNF216（又は AWP1）が発現する際に、N 末端側に翻訳開始メチオニン残基に続き FLAG 認識配列が配列されるように、本願発明者が p cDNA3（プラスミド、Invitrogen 社）を元に独自に改変したものである。そして、ZNF216（又は AWP1）をコードする cDNA を p cDNA-FLAG に組み込む時には、制限酵素処理をする際に、ZNF216（又は AWP1）の翻訳開始メチオニンも切断して、翻訳開始メチオニンをコードする配列を除いた ZNF216（又は AWP1）をコードする cDNA を、p cDNA-FLAG（プラスミド）に導入するようにした。なお、「FLAG 認識配列」とは、アミノ酸配列「DYKDDDDK」のことをいい、このアミノ酸配列を目的のタンパク質（本実験では ZNF216 又は AWP1）の末端配列にあらかじめ組み込んでおくことにより、FLAG 認識配列が、その目的タンパク質を認識するためのタグ（標識）として機能する。

【0042】

続いて、ZNF216 遺伝子（又は AWP1 遺伝子）が組み込まれた、FLAG 認識配列の付いた発現ベクター（組換え p cDNA-FLAG）を培養細胞に導入した（トランスフェクション）。遺伝子導入する培養細胞は HEK293T 細胞、トランスフェクション試薬はキアゲン（株）の Polyfect を用いた。遺伝子導入の手順は同製品のプロ

トコールに従った。

【0043】

トランスフェクションした培養細胞内では、タグが融合した組み換えタンパク質が発現する。そして、発現した一部組換え ZNF216 (又は AWP1) は、細胞内に存在する未知のパートナータンパク質と相互作用し複合体を形成する。そして、ZNF216 (又は AWP1) と未知パートナータンパク質との複合体を、ZNF216 (又は AWP1) に付したタグに対する抗体を用いた公知の「免疫沈降法」によって、細胞内から抽出した。

【0044】

抽出方法は、次の通りである。遺伝子導入した細胞を可溶化バッファー (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1% Triton X100) を用いて可溶化した。この可溶化バッファーを加えたのち細胞を掻き取り、遠心管に回収し超遠心 (55,000 回転, 4℃, 20 分) した。

【0045】

遠心後の細胞抽出液 (上清) に FLAG ペプチド抗体を固定化したアガロースビーズ (SIGMA 社から購入) を加え 4℃ で 3 時間攪拌した。攪拌後のビーズを遠心 (1,000 回転, 4℃, 1 分) して集め可溶化バッファーで洗浄後、FLAG ペプチドを含むバッファーを加えることによりビーズに結合した ZNF216 (AWP1) を溶出し、ZNF216 (AWP1) と目的のパートナータンパク質が結合したタンパク質複合体を回収した。

【0046】

タンパク質複合体の回収後は、相互作用の相手となるたんぱく質を、公知のタンデム質量計 (MS/MS) を用いる「質量タグ法」と称される公知の方法 (羊土社「プロテオーム解析法」、磯辺俊明、高橋信弘編、P129～P142) によって同定した。具体的な手順は以下の通りである。

【0047】

まず、回収したサンプルを、遠心濃縮後、酵素反応用バッファー (100 mM Tris, pH 8.8) に溶解した。次に、特定のアミノ酸を認識し切断する酵素である「トリプシン」あるいは「リジルエンドペプチダーゼ」により消化分解した。なお、本実験では、リジルエンドペプチダーゼを用いた。酵素基質比 (重量比) が 1/100 から 1/50 になるようにリジルエンドペプチダーゼを加え 37℃ で 12 時間反応させ、消化物を得た。そして、その消化物をタンデム質量計で測定し、分解された各ペプチドの質量値と内部アミノ酸配列情報を得た。

【0048】

酵素消化されたペプチド断片の質量値を用いて、データベース上から候補アミノ酸シーケンスを自動検索して選び出し、かつその配列が各アミノ酸でフラグメント化したときの質量値セットを計算した。

【0049】

なお、前記データベースは、既に公開されているタンパク質データベースである「SwissProt」 (インターネットアドレス: ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/sp_tr_nrdh/fasta/sprot.fas.Z) と核酸データベースである「NCBI RefSeq」 (インターネットアドレス: ftp.ncbi.nih.gov/refseq/H_sapiens/mRNA_Prot/hs.faa.gz) を使用した。

【0050】

この計算値と実測のフラグメントイオン (MS/MS スペクトラム) を比較することによって、ZNF216 及び AWP1 のパートナータンパク質を同定したところ、両方とも、「プロテアソーム」を構成するタンパク質群であることが判明した。これにより、ZNF216 又は AWP1 とプロテアソームは相互反応を示すことが明らかになった。また、「ポリユビキチン鎖」についても、ZNF216 及び AWP1 のパートナータンパク質として同定された。これにより、ZNF216 又は AWP1 とポリユビキチン鎖の間にも相互反

応があることが明らかになった。

【実施例 2】

【0051】

実施例 2 では、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) を用いて、ポリユビキチン鎖と ZNF 216 又は AWP 1 との間に相互作用があることを確認する実験を行った。

【0052】

まず、ZNF 216 と GST との融合タンパク質を、遺伝子工学的に大腸菌で生産した。そして、その融合タンパク質をグルタチオンカラム (グルタチオンセファロースビーズ) を使って、精製した。カラム内では、GST とグルタチオンが特異的に結合するため、GST と融合した ZNF 216 のみが、カラム内で捕捉される。その捕捉された融合タンパク質を、溶出バッファーを用いて回収した。

【0053】

次に、回収した ZNF 216 と GST との融合タンパク質とポリユビキチン鎖を混合し、混合した溶液を、再び、グルタチオンカラムを使って、精製し、溶出バッファーを用いて回収した。

【0054】

回収した溶液には、GST と融合した ZNF 216 とともに、ポリユビキチン鎖も回収された。このことは、ZNF 216 とポリユビキチン鎖が結合親和性を有し、相互作用することを示している。

【0055】

また、AWP 1 と GST との融合タンパク質を、前記と同様に生産し、同様に、相互作用があることを確認する実験を行った。その結果、AWP 1 とポリユビキチン鎖は、ZNF 216 と同様に、結合親和性があり、相互作用することが示された。

【実施例 3】

【0056】

実施例 3 は、筋萎縮と ZNF 216 との間に関連性があることを示す実験である。

【0057】

マウスの坐骨神経を切除した筋萎縮モデルマウスと、マウスを絶食させることにより筋萎縮を起こした絶食誘導性筋萎縮モデルマウスを用意した。そして、これらのマウスで筋萎縮が見られる骨格筋組織における ZNF 216 をコードする遺伝子の mRNA 量と、同組織における ZNF 216 タンパク質の発現量を測定した。その結果、筋萎縮を起こしたマウスでは、ZNF 216 をコードする遺伝子の mRNA 量及び ZNF 216 タンパク質発現量が顕著に増加した。このことは、筋萎縮が起こる機序において、ZNF 216 が関与していることを示している。

【実施例 4】

【0058】

実施例 4 では、RNA 干渉を応用し、配列番号 5 に示された塩基配列を有する二本鎖 RNA を用いて、AWP 1 (配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質) の発現を抑制する実験を行った。

【0059】

この実験では、(1) 配列番号 5 に示した配列を設計して DNA を合成し、(2) 制限酵素とライゲーション反応により、配列番号 5 に対応する DNA をプラスミドベクターに組み込み、(3) トランスフェクションにより、そのプラスミドベクターからウイルスベクター (レトロウイルス) を作製し、(4) 標的細胞 (マウス培養細胞) へその組換えウイルスを感染させて、(5) RNA 干渉の効果を判定する、という方法を用いた (羊土社「RNAi 実験プロトコル」、多比良和誠ら編、P 116 ~ P 128 を参照)。具体的な手順は、以下の通りである。

【0060】

配列番号 5 の配列は、次のように設計されている。最初の「GGATCC」配列は、プ

ラスミドベクターに導入する際に、制限酵素（今回の設計ではBamH1）によって切断される部位である。次の「ATGGCATGTGTTCAGTATG」配列（19塩基）は、センス鎖であり、AWP1をコードする塩基配列の一部に対応した配列である。次の「TTCAAGAGA」配列は、リンカー配列であり、センス鎖と後述のアンチセンス鎖が二本鎖を形成した時に、ヘアピン状にカーブして、ステム＝ループ構造を形成させるために設計された配列である。続く「CATACTGAACACATGCCAT」配列（19塩基）は、アンチセンス鎖であり、前記のセンス鎖と相補的になっている。次の「TTTTT」配列は、ターミネーター配列（mRNA転写終結部分）で、後に、組換えレトロウイルスの3'末端のLTR（繰り返し配列）にあるH1プロモーターの配列の部分から、このターミネーター配列の部分までが、RNAポリメラーゼ3によって転写され、目的のmRNAが発現する。最後の「GTCGAC」配列も、プラスミドベクターに導入する際に、制限酵素（今回の設計ではSal1）によって切断される部位である。後に、二本鎖RNAが合成される際には、センス鎖とアンチセンス鎖が相補的に結合して、二本鎖が形成され、リンカー配列の部分は、ヘアピン状にカーブして、センス鎖とアンチセンス鎖が結合できるようにする。以上のように、配列番号5の配列を設計し、配列番号5の配列を持つDNA（オリゴヌクレオチド）を合成した。

【0061】

次に、本実験では、合成したDNAを制限酵素とライゲーション反応を用いてプラスミドベクターに組み込んだ。プラスミドベクターは、本願発明者が独自に作製したもので、組換えレトロウイルスをコードする配列があらかじめ組み込まれたものである。組換えレトロウイルスをコードする配列は、レトロウイルスから逆転写されたcDNA配列と同じ配列のもので、そのうち、ウイルスの感染から宿主細胞のDNAに組み込まれるまでに必要な遺伝子はそのままだし、ウイルスゲノムの発現やウイルスタンパク質の発現に関与する配列部分は除去した配列を有している。また、この組換えレトロウイルスをコードする配列には、薬剤（puromycin）耐性遺伝子の発現ユニットを挿入しており、ウイルス感染細胞のみをpuromycin処理により選択できる設計となっている。そして、組換えレトロウイルスをコードする配列のうち、3'LTR配列の中に、H1プロモーター配列と、それに続く、二箇所の制限酵素によって切断される配列の部分（今回の設計では、Bgl2とSal1）がある。なお、Bgl2は、BamH1と切断端が一致する制限酵素である。

【0062】

合成したDNAをプラスミドベクターに組み込む際には、合成DNAの制限酵素の切断部位とプラスミドのクローニングサイトを、それぞれ二種類の制限酵素で二箇所切断した後、ライゲーションキットを用いて合成DNAとプラスミドベクターを結合させた。なお、今回の実験では、合成DNAは、BamH1とSal1で、プラスミドは、Bgl2とSal1で、それぞれ切断した。BamH1とBgl2は、切断端が同じなので、合成DNAのBamH1切断部位とプラスミドのBgl2の切断部位、合成DNAのSal1切断部位とプラスミドのSal1切断部位を、それぞれ連結反応（ライゲーション）させて、合成DNAをプラスミドに組み込んだ。そして、合成DNAを組み込んだプラスミドベクターを、コンピテント細胞を用いてサブクローニングしたのち、クローン化した組換えプラスミドベクターを精製した。

【0063】

次に、前記の手順で精製した組換えプラスミドベクターを、培養細胞にトランスフェクションして、組換えレトロウイルスを作製した。ここで、組換えプラスミドベクターには組換えレトロウイルスをコードする配列が含まれているが、この配列には、レトロウイルスが完成し、細胞外に放出するために必要な遺伝子がすべてあらかじめ除去されているため、組換えレトロウイルスは産生されない。そこで、トランスフェクションに際しては、レトロウイルスの完成に必要なタンパク質をコードする遺伝子をあらかじめ組み込んだプラスミドも同時にトランスフェクションして、培養細胞内で、組換えレトロウイルスが完成し、細胞外に放出されるようにした。そして、培養細胞の外に放出された、合成DNA

の配列が組み込まれた組換えレトロウイルスを回収した。

【0064】

そして、マウス培養細胞に組換えレトロウイルスを感染させた。この組換えレトロウイルスは、感染後、逆転写されてcDNAが合成され、そのcDNAが宿主細胞のDNA配列の中に組み込まれるが、レトロウイルスの発現に必要な配列は除去してあるため、レトロウイルスは発現しない。そして、宿主細胞に組み込まれた配列のうち、H1プロモーター配列からその転写終結配列の部分までが、宿主細胞にあるRNAポリメラーゼ3の作用により転写される。以上の手順により、合成RNAが安定的に発現するマウス培養細胞を作製した。なお、この合成RNAは、宿主細胞内でリンカー配列が除去される等の修飾を受け、RNA干渉をおこす二本鎖RNAとなる。この二本鎖RNAが、マウス培養細胞内にあることにより、対応するmRNAが特異的に分解され、対応するタンパク質の発現を阻害する。

【0065】

二本鎖RNAによって、RNA干渉が引き起こされているかどうかの判定は、AWP1をコードするmRNAに対するノーザンブロット法によって行った。組換えレトロウイルスが感染したマウス培養細胞からRNAを抽出し、AWP1をコードするmRNAの発現量を調べた結果、AWP1の発現が抑えられていることがわかった。

【0066】

以上の結果から、RNA干渉を応用することにより、AWP1の発現を抑制できることがわかった。AWP1の発現が抑制されることにより、AWP1とプロテアソームとの相互作用、又は、AWP1とポリユビキチン鎖との相互作用が抑えられる。これらの相互作用が抑えられることによって、ある個体が寝たきりなどの長期臥床、神経麻痺、四肢の長期固定、宇宙環境に長期間滞在することなどにより筋肉への付加が著しく低下した状態で発症する廃用性筋萎縮、等になっている場合にも、その情報がプロテアソームに伝達されないため、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解はおこらない。従って、RNA干渉を応用した二本鎖RNAは、廃用性筋萎縮の治療剤として有効である。

【0067】

なお、この実施例は、RNA干渉を応用した二本鎖RNAが、廃用性筋萎縮治療剤として有効であることを示した実施例の一つに過ぎず、この実施例に狭く限定されない。特に、実験の方法や手段、及び、RNA干渉に用いる二本鎖RNAの配列部位の選択について、狭く限定されない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> · National Institute of advanced Industrial Science and Technology
 · Japan Biological Informatics Consortium

<120>

A novel interaction between proteins and method for Disused Muscle Atrophy using
 the interaction between proteins

<130> P178

<160> 5

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ZNF216 (Zub 1)

<400> 1

Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Asn	Gln	Thr	Pro	Gly	Pro	Met	Leu	Cys	Ser
1				5					10					15
Thr	Gly	Cys	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Pro	Arg	Thr	Asn	Gly	Met	Cys
				20					25					30
Ser	Val	Cys	Tyr	Lys	Glu	His	Leu	Gln	Arg	Gln	Gln	Asn	Ser	Gly
				35					40					45
Arg	Met	Ser	Pro	Met	Gly	Thr	Ala	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Pro	Thr
				50					55					60
Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Val	Gln	Arg	Ala	Asp	Thr	Ser	Leu	Asn	Asn
				65					70					75
Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Arg	Asn	Val
				80					85					90
Pro	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Gln	Gln	Met	Thr	Glu	Met	Ser
				95					100					105
Ile	Ser	Arg	Glu	Asp	Lys	Ile	Thr	Thr	Pro	Lys	Thr	Glu	Val	Ser
				110					115					120
Glu	Pro	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Pro	Ser
				125					130					135
Thr	Ser	Gln	Ser	Glu	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Lys
				140					145					150
Lys	Asn	Arg	Cys	Phe	Met	Cys	Arg	Lys	Lys	Val	Gly	Leu	Thr	Gly
				155					160					165
Phe	Asp	Cys	Arg	Cys	Gly	Asn	Leu	Phe	Cys	Gly	Leu	His	Arg	Tyr
				170					175					180
Ser	Asp	Lys	His	Asn	Cys	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala
				185					190					195
Ala	Lys	Ile	Arg	Lys	Glu	Asn	Pro	Val	Val	Val	Ala	Glu	Lys	Ile
				200					205					210
Gln	Arg	Ile												
				213										

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> AWP1(Zub 2)

<400> 2

Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Asn	His	Ser	Gln	Val	Pro	Met	Leu	Cys	Ser
1				5					10					15
Thr	Gly	Cys	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Pro	Arg	Thr	Asn	Gly	Met	Cys
				20					25					30
Ser	Val	Cys	Tyr	Lys	Glu	His	Leu	Gln	Arg	Gln	Asn	Ser	Ser	Asn
				35					40					45
Gly	Arg	Ile	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Glu
				50					55					60
Ser	Leu	Pro	Val	Gln	Cys	Thr	Asp	Gly	Ser	Val	Pro	Glu	Ala	Gln
				65					70					75
Ser	Ala	Leu	Asp	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Met	Gln	Pro	Ser	Pro	Val
				80					85					90
Ser	Asn	Gln	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Gln	Leu
				95					100					105
Asp	Ser	Thr	Ser	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Pro	Glu	Thr	Glu	Asp	Val
				110					115					120
Gln	Ala	Ser	Val	Ser	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Pro	Ser	Glu	Glu	Gln
				125					130					135
Ser	Lys	Ser	Leu	Glu	Lys	Pro	Lys	Gln	Lys	Lys	Asn	Arg	Cys	Phe
				140					145					150
Met	Cys	Arg	Lys	Lys	Val	Gly	Leu	Thr	Gly	Phe	Glu	Cys	Arg	Cys
				155					160					165
Gly	Asn	Val	Tyr	Cys	Gly	Val	His	Arg	Tyr	Ser	Asp	Val	His	Asn
				170					175					180
Cys	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Lys	Ile	Arg	Lys
				185					190					195
Glu	Asn	Pro	Val	Val	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Gln	Lys	Ile		
				200					205			208		

<210> 3

<211> 642

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ZNF216

<400> 3

atggctcagg	agactaacca	gaccccgagg	cccatgctgt	gtagcacagg	50
atgtggcttt	tatggaaatc	ctaggacaaa	tggaatgtgt	tcagtttgct	100
acaaagaaca	tcttcagagg	cagcaaaata	gtggcagaat	gagcccaatg	150
gggacagcta	gtggttccaa	cagtcctacc	tcagattctg	catctgtaca	200
gagagcagac	actagcttaa	acaactgtga	aggtgctgct	ggcagcacat	250
ctgaaaaatc	aagaaatgtg	cctgtggctg	ccttgcctgt	aactcagcaa	300
atgacagaaa	tgagcatttc	aagagaggac	aaaataacta	ccccgaaaac	350
agaggtgtca	gagccagttg	tcactcagcc	cagtccatca	gtttctcagc	400
ccagtacttc	tcagagtga	gaaaaagctc	ctgaattgcc	caaaccaaaag	450
aaaaacagat	gtttcatgtg	cagaaagaaa	gttggtctta	cagggtttga	500

ctgccgatgt ggaaatttgt tttgtggact tcaccgttac tctgacaagc 550
acaactgtcc gtatgattac aaagcagaag ctgcagcaaa aatcagaaaa 600
gagaatccag ttgttgtggc tgaaaaaatt cagagaatat aa 642

<210> 4

<211> 627

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> AWP1

<400> 4

atggctcaag aaactaatca cagccaagt cctatgcttt gttccactgg 50
ctgtggattt tatggaaacc ctctgacaaa tggcatgtgt tcagtatgct 100
ataaagaaca tcttcaaaga cagaatagta gtaatggtag aataagccca 150
cctgcaacct ctgtcagtag tctgtctgaa tctttaccag ttcaatgcac 200
agatggcagt gtgccagaag ccagtcagc attagactct acatcttcat 250
ctatgcagcc cagccctgta tcaaatcagt cacttttata agaatctgta 300
gcattcttc aattggacag tacatctgtg gacaaagcag tacctgaaac 350
agaagatgtg caggcttcag tatcagacac agcacagcag ccatctgaag 400
agcaaagcaa gtctcttgaa aaaccgaaac aaaaaaagaa tcgctgtttc 450
atgtgcagga agaaagtggg acttactggg tttgaatgcc ggtgtggaaa 500
tgtttactgt ggtgtacacc gttactcaga tgtacacaat tgctcttaca 550
attacaaagc cgatgctgct gagaaaatca gaaaagaaaa tccagtagtt 600
gttggtgaaa agatccaaaa gatttga 627

<210> 5

<211> 70

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> siRNA of AWP1

<400> 5

ggatcccatg gcatgtgttc agtatgttca agagacatac tgaacacatg 50
ccattttttt ggaagtcgac 70

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質間の新規な相互作用の提供。

【解決手段】 プロテアソームと ZNF216（又は、AWP1）との間にタンパク質間相互作用があることがわかった。また、ポリユビキチン鎖と ZNF216（又は AWP1）の間にもタンパク質間相互作用があることがわかった。この新規なタンパク質間相互作用を利用して、廃用性筋萎縮の治療剤、及び、廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法、疾病診断用マーカー、発症リスク評価方法等を提供する。

特願 2 0 0 3 - 4 0 8 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 3 - 4 0 8 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 3 0 4 3 1 9]

- | | |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 1 年 7 月 3 1 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3 |
| 氏 名 | 国立療養所中部病院長 |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 5 月 2 8 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3 |
| 氏 名 | 国立長寿医療センター総長 |